

特開平8-233773

(43)公開日 平成8年(1996)9月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327			G 0 1 N 27/30	3 5 3 F
C 0 7 C 323/58		7419-4H	C 0 7 C 323/58	
323/60			323/60	
C 0 7 D 207/323			C 0 7 D 207/323	
403/12	2 0 7		403/12	2 0 7
審査請求 有 請求項の数13 O L (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-216409

(22)出願日 平成7年(1995)8月24日

(31)優先権主張番号 P 4 4 3 0 0 2 3 : 9

(32)優先日 1994年8月24日

(33)優先権主張国 ドイツ (D E)

(71)出願人 594057093

ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー
ハードイツ連邦共和国 68305 マンハイム-
ワルドホフ, サンドホファー シュトラ-
セ 112-132

(72)発明者 ベトラ リューガー

ドイツ連邦共和国 D-82377 ベンツベ
ルク ビルケンシュトラ-セ 13番地

(72)発明者 ドロシー アンブロシウス

ドイツ連邦共和国 D-81477 ミュンヘ
ン ミノーシュトラ-セ 2番地

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 電気化学センサー

(57)【要約】

【解決手段】貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質とイオン結合、共有結合または金属キレート結合によって連結しており、かつ、該結合分子の支持材への被覆率は最大被覆率よりも小さい、電気化学センサー。

【効果】本発明により、高電導度及び高感度を有する電気化学センサーが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質とイオン結合、共有結合または金属キレート結合によって連結しており、かつ、該結合分子の支持材への被覆率は最大被覆率よりも小さい、電気化学センサー。

【請求項2】 支持材が金またはパラジウム表面を有する、請求項1記載のセンサー。

【請求項3】 アンカー基がチオール、ジスルフィドおよび／またはホスフィン基である、請求項1または2記載のセンサー。

【請求項4】 単層が、アンカー基によって支持材に吸着されて結合しており、酵素的に活性なタンパク質には連結していない希釈分子をさらに含有するものである、請求項1～3のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項5】 結合分子が、結合分子の荷電末端基と酵素的に活性なタンパク質の反対荷電部位との間で形成されるイオン結合によって、酵素的に活性なタンパク質と連結している、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項6】 結合分子が、結合分子の反応性基と酵素的に活性なタンパク質の反応性基との間で形成される共有結合によって酵素的に活性なタンパク質と連結している、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項7】 結合分子が、結合分子のキレート形成性末端基と、金属イオンと、および酵素的に活性なタンパク質のキレート形成性領域との間で形成される金属キレート結合によって酵素的に活性なタンパク質と連結している、請求項1～4のいずれか1項に記載のセンサー。

【請求項8】 結合分子が、アンカー基と、酵素的に活性なタンパク質と結合を形成し得る末端基との間に、スペーサーを含有する、請求項1～7のいずれか1項に記載のセンサー。

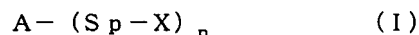
【請求項9】 貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質のN-および／またはC-末端の少なくとも1個の荷電アミノ酸残基とイオン結合によって連結している、電気化学センサー。

【請求項10】 貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質のN-および／またはC-末端で少なくとも1個のキレ-

ト形成性アミノ酸残基と金属キレート結合によって連結している、電気化学センサー。

【請求項11】 アナライトの電気化学的に検出可能な反応を導く条件下で、試料溶液を請求項1～10のいずれか1項に記載のセンサーと接触させ、アナライトの反応を電気化学的測定によって定量する、試料溶液中のアナライトの定量方法。

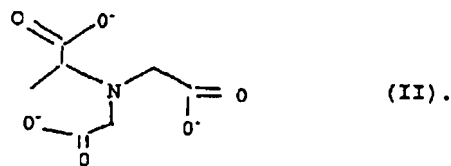
【請求項12】 一般式 (I) :



【式中、AはHS若しくはH₂P基を表し、かつ、nは1を表すか、またはAは-S-S基を表し、かつ、nは2を表し、S_pは原子数4～30の鎖長のスペーサーを表し、そしてXはマレイミド基または少なくとも2個の正荷電または負荷電を有する基を表す。】で示される化合物。

【請求項13】 Xがグアニジン基または式 (II) :

【化1】



で示される基である請求項12記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、貴金属表面を有する支持材、及び該貴金属表面に吸着されて結合している酵素的に活性なタンパク質を含有する電気化学センサーに関するものである。

【0002】

【従来の技術】電気化学的測定によるアナライトの定量のために酵素センサーを適用することは知られている

(例えば、Turner et al., Biosensors, Fundamentals and Application (1987), Oxford University Press)。センサー表面への酵素の固定化は、これまでは通常、重合体に結合させ、2官能性試薬によって架橋させて、膜の内側および膜の中に封入することによって、実施されてきた。これらの方法は、酵素分子が固相の厚い層の中に統計的に分布するという不都合がある。その結果、アナライトが酵素の活性中心に拡散すること、および生成物が電極に拡散することが阻害され、センサーの反応時間が長くなり、感度が低下する。このタイプの固定化のさらに不都合な点は、酵素がセンサーの表面に共有結合によって結合している場合、活性中心の変化に起因する活性の損失がしばしば生じることである。上記の固相への酵素の結合方法は、例えばA. Weisman (Handbook of Enzyme Biotechnology, Alice Horwood, Chichester (1985), 2nd Edition. 166 ff) またはO. Zaborosky (Immobilised Enzymes, CRC Press, Cleveland Ohio (1974), 2nd E

dition) によって記載されている。

【0003】固相上への一定の薄い単層の生成および生物学的成分の固定化のためのこれらの単層の使用は以前から知られている。これに関して、例えば、Leeら (Sens. Act. B, 12(1993), 153-158) は、アビジンを吸着し、続いてビオチンで標識したグルコースオキシダーゼをこのアビジンに結合させるためのLangmuir-Blodgett 膜について述べている。FR-A-2682765はLangmuir-Blodgett 法におけるグルコースオキシダーゼと両親媒性分子との組合せ適用について開示している。センサーへの脂質の2層の使用もTienらによって述べられている (Crit. Rev. Biomed. Eng., 18(1991)323-340)。Langmuir-Blodgett の欠点は不安定であることである。

【0004】分子の薄層を製造するためのさらに可能な方法は、BainおよびWhitesides (Ang. Chem. 101(1988), 552-528) によって述べられた、いわゆるSAM (self-assembling monolayer; 自己集合性単層) 法である。この自己集合性単層は、例えば金の表面に長鎖チオールを吸着させることによって形成される。Sawaguchiら (Bioelectrochemistry and Bioenergetics 29(1992), 127-133) およびWillnerら (J. Am. Chem. Soc. 114 (1992), 10965-10966) は、チオールによる金属表面へのジアフォラーゼおよびグルタチオンリダクターゼの固定化について述べている。Collinson およびBowden (Langmuir 8(1992), 1247-1250) は、16-メルカプトヘキサデカン酸および11-メルカプトウンデカン酸を使用した金属表面へのチトクロームCの固定化を開示している。表面のわずかに3分の1がチトクロームCによってふさがれているにすぎないことがわかった。Kinnear およびMonbouquette (Langmuir 9(1993), 2255-2257) は、自己集合性単層中の金属表面上に直接吸着する、酵素の取り込みについて記載している。

【0005】自己集合性単層中の酵素の固定化についてこれまでに述べられた方法は、酵素の低被覆密度、および形成された単層の低感度に関連した低電導度という欠点を有する。特に、長鎖チオールを使用した場合には酵素の金属からの距離が遠すぎることで、およびより短鎖のチオールを使用した場合には表面の均質性が実質上低下することに起因する問題がある。酵素の金属表面への直接の吸着もまた好適な均質層にならないし、さらに金属に直接吸着された場合はタンパク質の部分的な変性が生じ得る。

【0006】支持材、及びアンカー基を介して支持材に吸着され、少なくとも1個の遊離反応相手と結合し得る固相反応物を含有し、この固相反応物が支持材の表面に基本的に厚さが均一な希釈された結合層を形成することを特徴とする、結合マトリックスがWO 92/10757 によって知られている。WO 92/10757 に記載されている固相反応物は、例えば、ビオチンまたはハプテンである。固相反応物として酵素が使用される例は記載されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の基本課題は、当技術分野の現状での欠点が少なくとも実質的に排除された電気化学センサーを提供することである。特にセンサーは、酵素の高被覆密度を提供すべきであると同時に高電導度および高感度であるべきである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の課題の解決は、貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質とイオン結合、共有結合または金属キレート結合によって連結しており、結合分子の支持材への被覆率は最大被覆率よりも小さい、電気化学センサーによって達成される。

【0009】結合分子の被覆度は被覆度の最大値よりも小さい。すなわち、結合分子について希釈された層が存在する。酵素的に活性なタンパク質を用いた固相への被覆は、結合分子の被覆度を調節することによって最適化することができる。最適値において、密に充填された酵素の層が得られる。結合分子による単層の被覆度は100%より小さく、有効なのは1~99%、好ましくは2~98%、そして特に好ましくは5~95%である。

【0010】支持材上に吸着された結合分子は希薄層であるため、本発明の電気化学センサーは、固相上の被覆度が最大で好適に均一な配向性を有する酵素的に活性なタンパク質または酵素の単分子層を含有し、その結果センサーの応答速度の減少および表面積当たりのシグナル量の増大が得られる。このセンサーのさらに有利な点は、単層を単純な浸漬操作によって得ることができることである。さらに本発明のセンサーは、酵素の共有結合により、複合の、または連続した測定にも極めて好適である。

【0011】本発明のセンサーの支持材は貴金属表面を有しており、基本的に銀電極の電位よりも陽性な標準電極電位 (すなわち基準電極として標準水素電極 $Pt/H_2(1\text{atm})/H^+(a=1)$ に対する電位) を有するすべての貴金属または貴金属混合物若しくは貴金属合金が好適である。好適な貴金属の例はAu、Pt、Pd等である。支持材が金またはパラジウム表面を有するのが特に好ましい。

【0012】貴金属表面を有する支持材は、例えばガラスに厚さ約0.1~10nmの層が形成されるようにクロムを蒸着させることによって製造される。次にこのクロムの層は、支持材の表面になる層を形成する貴金属、例えば金によって蒸着される。貴金属層は好ましくは厚さ10~200nmである。プラスチック (例えばポリカーボネート) 製の支持材の場合は、支持材に直接貴金属を蒸着することも可能である。

【0013】支持材の表面への分子の吸着はアンカー基によって仲介される。アンカー基のタイプは対応する支持材の表面によって決まる。アンカー基として、チオール、ジスルフィドおよび／またはホスフィン基が特に好ましい。例えば金表面用のアンカー基としてチオールおよび／またはジスルフィド基が特に好ましく、パラジウム用にはホスフィン基が特に好ましい。

【0014】希釈結合層の製造のための各種の方法として、WO 92/10757 を引用する。最初の態様において、単層は単独の分子からなっており、表面はアンカー基によって完全には占められていない。こうした層は、例えば極めて低濃度（例えば、 $< 1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ）の結合分子を含む溶液中に表面を浸漬することによって製造することができる。この方法では、表面に結合分子の希薄なフィルムが得られ、続いてこの上に酵素を固定化することができる。

【0015】本発明の好ましい態様においては、単層は結合分子とは別に、支持材にアンカー基を介して吸着結合されているが、酵素的に活性なタンパク質とは連結しない希釈分子をさらに含有する。結合分子および希釈分子の単分子層の製造は、結合および希釈分子を必要なモル比で含有する溶液中に表面を浸漬することによって達成される。続いてこの被覆表面に酵素を固定化することができる。

【0016】センサーの製造においては、希釈分子に対する結合分子のモル比は、好ましくは $1:100 \sim 100:1$ 、特に好ましくは $1:50 \sim 50:1$ 、そして最も好ましくは $1:20 \sim 20:1$ である。本発明のセンサーの特定の適用においては、希釈分子に対する結合分子のモル比が $1:1$ より大きいもの、特に $5:1 \sim 20:1$ が好ましいようである。

【0017】希釈分子の使用により、酵素の被覆が最適化されるばかりでなく、驚くべきことに、電気的使用に際しての重要な規準である、層の電導度もまたかなり増大する。さらに、希釈分子は、センサーと接触する試料溶液中の成分の非特異的結合を減少させる。イオン結合、共有結合または金属キレート結合によって結合分子に連結される酵素的に活性なタンパク質は、好ましくは、電気化学的に検出し得る化合物を生成および／または消費する反応を触媒する酵素の群から選択される。こうした反応は、電気化学的に、例えば電位差測定または電流測定によってモニターすることができる。好ましくは、これらは、イオンが生成および／または消費される反応、 H_2O_2 が生成する反応、および／または電気化学的メディエーターが転換する反応を触媒する酵素である。こうした酵素の例は酸化還元酵素、すなわち、ある基質分子を酸化および／または還元することができる酵素である。しかし、加水分解酵素および反応中に pH の変化が生じる酵素も好適である。

【0018】好適な酵素の好ましい例は、グルコースオ

キシダーゼ（EC 1.1.3.4.）である。微生物アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）由来のグルコースオキシダーゼが例えばBoehringer Mannheim GmbH Company, GFRから市販されて入手できる。しかし、酵素的に活性なタンパク質は組換え酵素、すなわち異種宿主細胞から得られる酵素であってもよい。こうした組換え酵素の利点は、センサー表面で改善された固定化を可能にするような遺伝子操作による修飾型で酵素を使用することができる点である。好適な修飾の例は、例えばアルギニンまたはリシンなどの塩基性アミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸などの酸性アミノ酸、例えばヒスチジンまたはシステインなどのキレート形成性アミノ酸から選択された1または数種のアミノ酸残基のN-および／またはC-末端への付着である。

【0019】酵素は共有結合またはイオン結合によって、または金属キレート結合によって結合分子に連結される。酵素のイオン結合は、イオンまたはカチオン交換の化学の原理に基づくことができる。本発明のこの態様としては、結合分子の荷電末端基と酵素的に活性なタンパク質の反対荷電領域との間に生じる結合であるイオン結合によって、結合分子は酵素的に活性なタンパク質に連結する。ここで、結合分子の荷電末端基は、例えば、少なくとも1個のアミノ官能基を含有し、酵素的に活性なタンパク質の反対荷電領域は少なくとも1個の酸性アミノ酸残基、好ましくは、連続した、例えば2～8個のアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含有するのがよい。一方、結合分子の荷電末端基は、例えば、少なくとも1個のカルボキシレートおよび／または好ましくはスルホネート官能基を含有することができ、酵素の反対荷電領域は、少なくとも1個の塩基性アミノ酸残基、好ましくは、連続した、例えば2～8個のアルギニンおよび／またはリシン残基を含有することができる。この方法による酵素の固定化の利点は、固相への酵素の配向性を有した結合が可能なことである。さらに有利な点は、結合分子と反応する領域が酵素のN-および／またはC-末端に付着させた部分である場合、酵素の活性中心が妨害されない点である。

【0020】本発明のさらに別の態様においては、結合分子の反応性末端基と酵素的に活性なタンパク質の反応性基との間に生じる結合である共有結合によって、酵素が結合分子と連結することができる。結合分子の反応性末端基の好ましい例は、酵素のシステイン残基と結合することができるマレイミド基である。共有結合のさらに別の例は、結合分子中のジアゾニウム基に酵素のフェノール残基が結合することである。酵素の酸化糖残基が結合分子のアミノ末端基に結合することもまた可能である。本発明のセンサーに使用し得る共有結合固定化試薬の包括的な報告が、上記のWiseman およびZaborskyの参考文献に記載されている。ここではこの開示を引用する。

【0021】酵素を、結合分子のキレート形成性末端基と、金属イオンと、および酵素的に活性なタンパク質のキレート形成性部位との間で形成される金属キレートを紹介した結合によって固定化することもできる。結合分子のキレート形成性末端基は、例えばジカルボキシレート又はトリカルボキシレート基を含有することができ、酵素的に活性なタンパク質のキレート形成性領域は、一連の隣接するヒスチジン残基を含有することができる。好適なキレート形成性金属の例は、例えばニッケル、鉄コバルト、銅および亜鉛イオンである。結合が金属キレートによる場合にも、固相への酵素の配向性のある結合が可能である。

【0022】本発明のセンサーに関して、結合分子がアンカー基と、酵素的に活性なタンパク質に結合することのできる末端基との間にスペーサーを含有することもまた好ましい。アンカー基と酵素への結合部位との間のスペーサーの長さは、センサーの機能に対してかなりの影響を与え得る。長さを変えることによって、結合部位の酵素への接近ばかりでなく、電導度にも影響が及ぶ。スペーサーは、好ましくは、ヘテロ原子、例えばS、Nおよび/またはO原子を含んでいてもよい、4～30原子数のアルキレン鎖である。スペーサーは、特に好ましくは1～4個のC₂～C₄アルキレンオキシド単位、好ましくは1～4個のエチレンオキシド単位を含有する。

【0023】結合分子と同様に、希釈分子も固相への吸着に好適なアンカー基、すなわちチオール、ジスルフィドおよび/またはホスフィン基を含有する。希釈分子の他方の末端基は、好ましくは親水性官能基、例えばヒドロキシル、C₁～C₄アルコキシ、アミノ、カルボキシル、カルボン酸エステルまたはカルボン酸アミド官能基である。上記のスペーサーは、好ましくは希釈分子の末端基とアンカー基との間に位置する。希釈分子のスペーサーは好ましくは15原子数までで、少なくとも1個のエチレンオキシド単位を含有する。

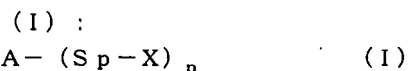
【0024】特にC-および/またはN-末端を修飾して、固相に均一な配向性を有して結合することができるようにした、遺伝的に修飾したタンパク質の製造、および配向性のある固定化タンパク質を有する固相が、WO 92/08788 に開示されている。酵素について可能な固定化方法としての、金属キレート結合またはイオン結合は開示されていない。Stayton ら (J. Am. Chem. Soc. 114 (1992), 9298-9299) は、遺伝的修飾によるチトクロームCの配向性結合、および酵素の表面に導入したシステイン残基の金表面への直接の結合について述べている。この方法の欠点は、この酵素の表面には、金属表面に吸着される基がそれ以外には存在しないと思われる点である。しかしながら、金属などの疎水性表面はしばしばタンパク質の高度の非特異的吸着性を有するものであるため、上記酵素センサーの使用には多大な欠点を有するものと予想される。

【0025】したがって、本発明の課題は、また、貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質のN-またはC-末端で少なくとも1個、好ましくは連続した荷電アミノ酸残基とイオン結合によって連結している、電気化学センサーである。

【0026】さらに本発明は、貴金属表面を有する支持材、及び支持材に吸着されて結合している、支持材表面上に基本的に厚さが均一な単層を含有する電気化学センサーであって、該単層はアンカー基を介して支持材に結合している結合分子を含み、該結合分子は酵素的に活性なタンパク質のN-またはC-末端で少なくとも1個、好ましくは連続した近接キレート形成性アミノ酸残基と金属キレート結合によって連結している、電気化学センサーに関するものである。

【0027】本発明はさらに、アナライトの電気化学的に検出可能な反応を導く条件下で、試料溶液を本発明センサーと共にインキュベートし、アナライトの反応を電気化学的測定、例えば電位差測定、または電流測定によって定量する、試料溶液中のアナライトの定量方法に関するものである。アナライトの好ましい例はグルコースであって、この場合には定量のために固定化グルコースオキシダーゼを有するセンサーを使用する。組換えDNA技術によって、酸性、塩基性、キレート形成性アミノ酸および/またはシステイン残基のN-および/またはC-末端での付着で修飾された、グルコースオキシダーゼが特に好適に使用される。

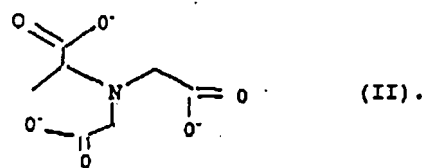
【0028】さらに本発明の別の主題は、一般式



【式中、AはHS若しくはH₂P基を表し、かつ、nは1を表すか、またはAは-S₂基を表し、かつ、nは2を表し、S_pは原子数4～30の鎖長のスペーサーを表し、そしてXはマレイミド基または少なくとも2個の正荷電または負荷電を有する基、例えばグアニジン基または式(II) :

【0029】

【化2】



【0030】で示される基を表す。】で示される化合物である。これらの化合物は、電気化学センサーの製造のために好適に使用される。以下の図1～7および配列表

と共に、実施例によって、さらに本発明をより明らかにする。

【0031】図1は、化合物を示す図である。

- a) 希釈分子 (化合物A)
- b) ビオチン基を有する結合分子 (化合物B)
- c) キレート形成性末端基を有する結合分子 (化合物C)
- d) 反応性マレイミド末端基を有する結合分子 (化合物D)

図2は、センサーのシクロボルタンモグラムの示す図である。

【0032】a) 純化合物Bで被覆したもの

b) 化合物AおよびBの混合物 (10:1) で被覆したもの

図3は、センサーのシクロボルタンモグラムの示す図である。

- a) 純化合物Cで被覆したもの
- b) 化合物AおよびCの混合物 (1:10) で被覆したもの

図4は、未被覆の金表面、希釈分子 (化合物A) で被覆された金表面、およびキレート形成性結合分子 (化合物C) で被覆された金表面への、グルコースオキシダーゼ-(His)₄の結合の、電流測定による定量結果を示す図である。

【0033】図5は、実施例6のセンサーにおける、電流シグナルのグルコース濃度への依存性を示す図である。図6は、実施例6のセンサーにおける、連続測定の再現性を示す図である。図7は、センサーのシクロボルタンモグラムの示す図である。

- a) 純化合物Dで被覆したもの
- b) 化合物AおよびDの混合物 (1:10) で被覆したもの

図8は、実施例7のセンサーにおける、電流シグナルのグルコース濃度への依存性を示す図である。

【0034】配列番号: 1は、プラスミドYE p L / AD-GODの構築に使用するプライマー (1) (実施例1. 1) を示す。

配列番号: 2は、プラスミドYE p L / AD-GODの構築に使用するプライマー (2) (実施例1. 1) を示す。

配列番号: 3は、プラスミドYE p L / GOD-(His)₄Cysの構築に使用するプライマー (3) (実施例1. 3) を示す。

【0035】配列番号: 4は、プラスミドYE p L / GOD-(His)₄Cysの構築に使用するプライマー (4) (実施例1. 3) を示す。

配列番号: 5は、プラスミドYE p L / GOD-Cysの構築に使用するプライマー (5) (実施例1. 4) を示す。

配列番号: 6は、プラスミドYE p L / GOD-Cysの

構築に使用するプライマー (6) (実施例1. 4) を示す。

【0036】

【発明の実施の形態】

実施例1:

修飾グルコースオキシダーゼ (GOD) 分子の製造

1. 1 プラスミドYE p L / AD-GODの構築

発現プラスミドYE p L / AD-GODは、プラスミドYE p L / GOD由来である (DE-A-43 01 904、実施例1. 1~1. 5の製造法および記載参照)。プラスミドYE p L / GODはアスペルギルス・ニガー由来のGOD遺伝子を含有し、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 中のGODの組換え発現および分泌に好適である。

【0037】構築に関する技術上の理由のため、YE p L / GOD中の非必須である正の調節遺伝子MAL2-8cp (GOD発現に使用するα-グルコシダーゼプロモーターを刺激する) をポリリンカーで置換した。これによって、ただ1個となったSph I制限切断部位を使用して、C-末端GOD融合タンパク質の構築が可能になる。

【0038】このため、プラスミドYE p L / GODを制限エンドヌクレアーゼBamH IおよびMlu Iによって消化し、約10.2 kbpの長さのBamH I / Mlu I-YE p L / GODベクター断片を単離し、ハイブリダイゼーションにより、2つのオリゴヌクレオチドから構築された、以下に示すDNAリンカーを連結した。

プライマー (1): 配列番号: 1

【0039】

【化3】

【0040】5'-CGCGTCGGCCGGTCCGACG-3'

【0041】

【化4】

【0042】5'-GATCCGTCGACCGGCCGA-3'

【化5】

MluI EcoRI SalI BamHI

5'-CGCGTCGGCCGGTCCGACG-3'

3'-AGCCGGCCAGCTGCCTAG-5'

【0043】所望のプラスミドYE p L / AD-GODは、制限地図によって同定し、さらに分析した。

1. 2 GOD-(His)₄の製造

発現プラスミドYE p L / GOD-(His)₄は4個のC-末端His残基が付加したGOD遺伝子を含有する。GOD-(His)₄の単離および酵素的特徴づけはDE-A-43 01 904 (実施例4、7および8) に記載されている。

【0044】1. 3 GOD-(His)₄Cysの製造

1. 3. 1 プラスミドYE p L / GOD-(His)₄Cys

の構築

このプラスミドは、C-末端に4個のヒスチジン残基および1個のシステイン残基が付加したGOD酵素変異体をコードする修飾GOD遺伝子を含む。プラスミドGOD-(His)₄と同様の方法によって、2種類の相補的オリゴヌクレオチドを使用して、プラスミドYE p L / AD-GODからプラスミドYE p L / GOD-(His)₄Cysを構築した。

【0045】このため、プラスミドYE p L / AD-GODをSph IおよびPvu IIによって切断し、約1.02 kbpの長さのSph I / Pvu II-YE p L /

【0049】

5'-CTGAATTCAACAGTGGTGGTGGTGGTGCATG-3'

Sph I

EcoRI

5'-CAGCACCACCACCACACTGTTGAATTCAG-3'

3'-GTACGTCGTGGTGGTGGTGACAACTTAAGTC-5'

----GlnHisHisHisHisCysStop

【0050】必要なプラスミドYE p L / GOD-(His)₄Cysを制限地図(新しいEcoRI切断部位)によって同定し、さらに部分配列決定(GOD構造遺伝子のC-末端領域)によって分析した。

1. 3. 2 GOD-(His)₄Cysの発現、精製および酵素的特徴づけ

DE-A-43 01 904(実施例4、7および8)に記載された、GOD-(His)₄に関する記載にしたがって、発現、精製および酵素的特徴づけを実施した。

【0051】1. 4 GOD-Cysの製造

1. 4. 1 プラスミドYE p L / GOD-Cysの構築

このプラスミドは、C-末端にさらに1個のシステイン残基を有するGOD酵素変異体をコードする修飾GOD遺伝子を含む。プラスミドGOD-(His)₄Cysと同様の方法によって、2種類の相補的オリゴヌクレオチドを使用して、プラスミドYE p L / AD-GODからプラスミドYE p L / GOD-Cysを構築した。

【0052】このため、プラスミドYE p L / AD-GODをSph IおよびPvu IIによって切断し、約1.02 kbpの長さのSph I / Pvu II断片を単離し、2種類のオリゴヌクレオチドからハイブリダイゼーションによって構築された以下に示すDNAリンカーを連結した。

プライマー(5): 配列番号: 5

【0053】

【化9】

5'-CACTGTTAATGAATTCAG-3'

【0054】プライマー(6): 配列番号: 6

【0055】

【化10】

5'-CTGAATTCATTAACACTGCATG-3'

GODベクター断片を単離し、2種類のオリゴヌクレオチドからハイブリダイゼーションによって構築された以下に示すDNAリンカーを連結した。

プライマー(3): 配列番号: 3

【0046】

【化6】

5'-CAGCACCACCACCACACTGTTGAATTCAG-3'

【0047】プライマー(4): 配列番号: 4

【0048】

【化7】

【0056】

【化11】

Sph I

EcoRI

5'-CAGTGTTAATGAATTCAG-3'

3'-GTACGTCACAATTACTTAAGTC-5'

----GlnCysStop

【0057】所望のプラスミドYE p L / GOD-Cysを制限地図(新しいEcoRI切断部位)によって同定し、さらに部分配列決定(GOD構造遺伝子のC-末端領域)によって分析した。

1. 4. 2 GOD-(His)₄Cysの発現、精製および酵素的特徴づけ

DE-A-43 01 904(実施例4、7および8)における、GOD-(His)₄に関する記載にしたがって、発現、精製および酵素的特徴づけを実施した。

【0058】C-末端GOD融合タンパク質である、GOD-(His)₄、GOD-(His)₄-CysおよびGOD-Cysは、分泌、グリコシル化、炭水化物の量、比活性、熱安定性およびpH安定性に関し、酵母(野生型およびグリコシル化欠損酵母菌株)中の非修飾GOD酵素と同様の性質を有する。

【0059】実施例2

希釈分子の合成

A. 2 (S-アセチル)メルカプトプロピオン酸-2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミド

THF 25ml中の2-(2-アミノエトキシ)エタノール 2.14g (20mmol)溶液に、THF 50ml中のN-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオネート(WO-A-9 2/10757の実施例28にしたがって合成した) 5g (20mmol)溶液を15分間にわたって滴下し、20℃で2時間攪拌

した。反応終了 (TLCによってモニター) 後、反応混合物を真空中で蒸発させて濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製した。

収量 2.7g

TLC: シリカゲル60

溶離剤: エチルアセテート/メタノール=7:3 +1%酢酸

RF=0.67

MS (pos. FAB): $MH^+ = 236$

B. 2-メルカプトプロピオン酸-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)) エチルアミド

メタノール中 1mol/l ヒドロキシルアミン溶液600ml を”A”において合成した化合物2.7g (8.7mmol) に添加し、20℃で1時間攪拌した。その後溶媒を真空中で蒸発させ、残留物をジクロロメタンで3回抽出した。油状の粗生成物1.5gが得られ、シリカゲル上でフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。この化合物を希釈分子として使用することができる。

収量: 0.86g (無色油状)

TLC: シリカゲル60

溶離剤: ジクロロメタン/メタノール=9/1

RF=0.45

MS (pos. FAB): $MH^+ = 194$

C. ”B”において合成したチオール化合物を酸化することによって、ジスルフィド化合物、(化合物A)を合成した。

【0060】実施例3

キレート形成性結合分子 (化合物C) の合成

ブロモ酢酸28gを2NのNaOH75mlに溶解し、0℃に冷却した。N-Boc-Lリジンを2NのNaOH75mlに溶解し、このブロモ酢酸にゆっくりと滴下した。滴下後氷浴を除去し、70℃に加熱し、さらに2時間攪拌した。溶液を容積の半分まで濃縮し、続いて1NのHCl 300mlを混合した。この操作において白色の沈殿が生成する。生成物を4℃において3~4時間保ち、吸引濾過し、残留物を冷水で1回洗浄し、乾燥した。物質(15.3g)を続いてクロロホルム100ml中に懸濁させた。トリフルオロ酢酸20mlを添加し、室温で2時間攪拌した。クロロホルムおよびトリフルオロ酢酸を高真空中で除去し、粘性残留物をエーテル100mlに添加し、白色固体が沈殿するまで攪拌した。物質を吸引濾過し、洗浄し、乾燥した(収量15.3g)。この物質1.5gをメタノール30mlおよびトリエチルアミン1.62gに溶解した。攪拌しながらN-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート0.92gを添加した。室温で3時間攪拌し、続いて溶媒を除去した。生成物をシリカゲルカラムで精製した(収量2g)。この生成物をその後窒素下で12.5%アンモニア溶液40mlに溶解し、室温で1時間攪拌した。溶液を高真空中で濃縮し、続いて生成物をカラムクロマトグラフィーによって単離した(収量500mg)。

【0061】実施例4

反応性マレイミド基を有する結合分子 (化合物D) の合成

ジチオジプロピオン酸10.9g、N-ヒドロキシスクシンイミド12.7gおよびジシクロヘキシルカルボジイミド22.7gをDMF 100mlおよびジオキサン100ml中に溶解し、室温で12時間攪拌した。続いて、沈殿物を吸引濾過し、溶媒を除去した。油状残留物18.5gが得られた。生成物2.06gをジオキサン100ml中に溶解した。この溶液にモノ-N-Boc-1, 8-ジアミノ-3, 6-ジオキサオクタン2.78gを添加し、室温で12時間攪拌した。その後、生成物にトリフルオロ酢酸 2.2mlを混合し、ロータリーエバポレーターで約20mlまで濃縮し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶媒除去後、油状の生成物約4gが得られた。この生成物をジオキサン50mlに溶解し、この溶液に、ジオキサン10ml中のマレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル3.1gを添加した。混合物を室温で12時間攪拌し、続いて溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。白色粉末状の生成物190mgが得られた。

【0062】実施例5 (比較)

ポリカーボネート支持体上に金 $2 \times 40\text{nm}$ を連続して蒸着させた。続いてこの支持体を、ビオチン化合物B (合成: W0-A-92/10757の実施例29参照) および化合物A (合成: 実施例2参照) の水中におけるモル比1:10の $5 \times 10^{-4}\text{mol/l}$ 混合物中で1時間インキュベートした。水中で完全に洗浄した後、アルゴン気流中で乾燥した。

【0063】シクロボルタンメトリーによって、1mmol/l $K_4[Fe(CN)_6]$ およびN,N-ジメチルニトロソアニリンの電気化学的転換の特徴づけを行った。純化合物Bの非希釈SAMはヘキサシアノ鉄酸塩の転換をほぼ完全に妨害したが、混合層を適用することにより、表面の良好な電導性が得られた(図2)。表面プラズモン共鳴および接触角測定の結果は表面の濃密な被覆を示唆した。

【0064】続いて、結合分子 (化合物B) および希釈剤 (化合物A) を被覆した電極を0.1mol/lリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)中のストレプトアビジン溶液(1mg/ml)に1時間浸漬し、緩衝液で洗浄し、上記緩衝液中のビオチン化グルコースオキシダーゼ溶液(1mg/ml)中で1時間インキュベートした。緩衝液および水で再び完全に洗浄した後、センサーを使用に供した。

【0065】アナライト、この場合はグルコース(10mmol/ml)の定量を電流測定によって実施した。メディエーター、例えば濃度 $1 \times 10^{-3}\text{mol/l}$ のN-ニトロソアニリンを試料溶液に添加し、2分間のインキュベートの後、メディエーターに適した適用電圧、この場合は240mVにおいて電流を測定した。グルコースを添加した時、GOD活性は光度測定によれば検出できたにもかかわらず、このセンサーではきわめて少量の電流が得られたの

みであった。このように、W0-A-92/10757 に記載された全面にわたる結合相は電気化学的酵素センサーには最適ではない。次の実施例で、電気化学的適用のための好適な構造を達成するのに必要な修飾結合分子について述べる。

【0066】実施例6

金支持体は実施例5のものと同様とした。支持体をメタノール中 2×10^{-3} mol/l の化合物C（メルカプトニトリロ三酢酸）と化合物Aとの混合物中で1時間インキュベートした。純メタノールおよび水によつて連続して完全に洗浄した後、これらを0.2%NiCl₂水溶液中で10分間インキュベートし、再び水で数回洗浄し、アルゴン気流中で乾燥した。

【0067】シクロボルタンメトリーを使用して、この層の特徴づけを行った（実施例5参照）。純化合物Cの適用はK₄[Fe(CN)₆]などのような酸化還元活性物質の転換をかなり妨害するが、金表面に化合物Aをさらに結合させると、電極上のメディエーターの良好な反応が得られた（図3）。C-末端をヒスチジン残基で延長するという、遺伝子レベルで修飾したグルコースオキシダーゼ（実施例1参照）は、修飾支持体を0.1mol/lリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中の酵素溶液に1時間浸漬することによって、金属キレート結合を介して固相に結合した。

【0068】10mmol/lグルコース溶液、メディエーターとしてN, N-ジメチル-4-ニトロソアニリンを使用し、電位240mvにおいて、実施例5に記載されたようにして、機能面からの評価を行なった。図4は、金表面上での酵素の直接の固定化および純化合物Cの固定化よりも、選択した構造のセンサーの方がかなり高い感度を示す結果である。化合物CとAとのモル比10:1が最も好適であることがわかった。対照的に、純化合物Aの表面には酵素は結合しなかった。化合物CおよびAの混合物で被覆したセンサーのシグナルは、試料溶液中のグルコースの含有量に比例した（図5）。さらに、シグナルは数回繰り返して測定しても安定であった（図6）。

【0069】実施例7

金支持体は実施例1のものと同様とした。支持体をメタノール中総濃度 1×10^{-3} mol/l、モル比10:1（最適

値）の、化合物D（“マレイミドリンカー”）と化合物Aとの混合物中で1時間インキュベートした。メタノールおよび水で完全に洗浄した後、アルゴン気流中で乾燥した。

【0070】1mmol/lのK₄[Fe(CN)₆]を使用したシクロボルタンモグラムのよれば、純化合物Dが密に充填された層はN, N-ジメチル-ニトロソアニリンの転換を実質的に減少させることが示される。この障害は化合物Aの添加によって除去され、表面は、酸化還元反応に関して、金単独のものと同様の活性を有した（図7）。

【0071】続いて支持体を、0.1mol/lリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中のSH-修飾グルコースオキシダーゼ GOD-Cys（1mg/ml）溶液中で1時間インキュベートした。この操作において、酵素はリンカーのマレイミド末端基にチオール基を介して共有結合した。実施例5に記載されたように、アナライトの定量を実施した。図8はアナライト濃度に伴う電流の増加を示している。

【0072】

【発明の効果】本発明により、高電導度及び高感度を有する電気化学センサーが提供される。

【0073】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

起源：

生物名：アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)

直接の起源：

クローン名：YEP L/AD-GOD

配列：

【0074】

【化12】

配列の種類：他の核酸 18

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

配列：

【0076】

【化13】

トポロジー：直鎖状 18

配列の種類：他の核酸

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

起源：

【0075】配列番号：GGCGTCGGCC GGTGACG

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

【0077】配列番号：GATCCGTCGA CCGGCCGA

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

生物名：アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)

直接の起源：

クローン名：YEpL/GOD-(His)₄Cys

配列：

【0078】

【化14】

【0079】配列番号：4

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

CAGCACCACC ACCACTGTTG AATTCAG

配列の種類：他の核酸

27

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

配列：

【0080】

【化15】

【0081】配列番号：5

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

CTGAATTCAA CAGTGGTGGT GGTGCTGCAT G

起源：

31

生物名：アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)

直接の起源：

クローン名：YEpL/GOD-Cys

配列：

【0082】

【化16】

【0083】配列番号：6

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

CAGTGTTAAT GAATTCAG

配列の種類：他の核酸

18

記載： /desc="オリゴヌクレオチド"

配列：

【0084】

【化17】

【図面の簡単な説明】

CTGAATTCAT TAACACTGCA TG

グルコース濃度への依存性を示す図。

【図1】化合物を示す図。

【図2】センサーのシクロボルタンモグラムを示す図。

【図3】センサーのシクロボルタンモグラムを示す図。

【図4】電流測定による定量結果を示す図。

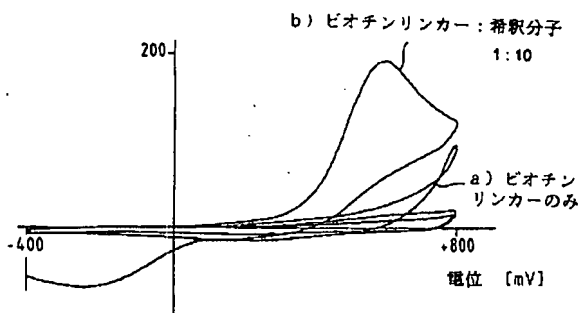
【図5】実施例6のセンサーにおける、電流シグナルの

【図6】実施例6のセンサーにおける、連続測定の再現性を示す図。

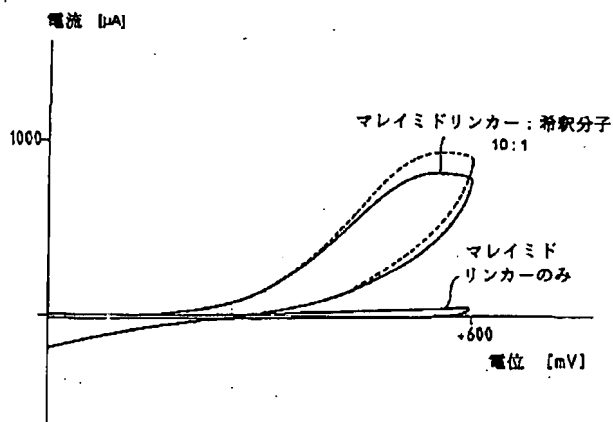
【図7】センサーのシクロボルタンモグラムを示す図。

【図8】実施例7のセンサーにおける、電流シグナルのグルコース濃度への依存性を示す図。

【図2】

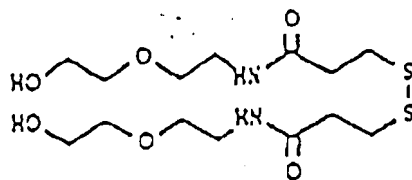


【図7】

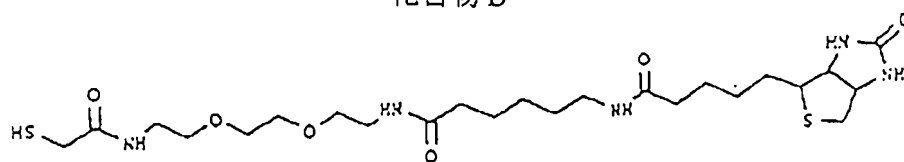


【图1】

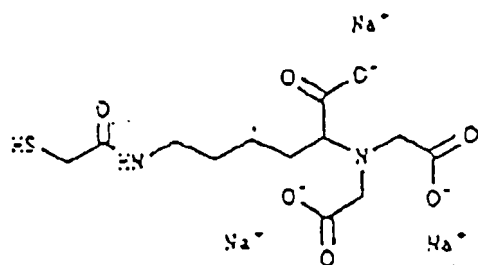
化合物 A



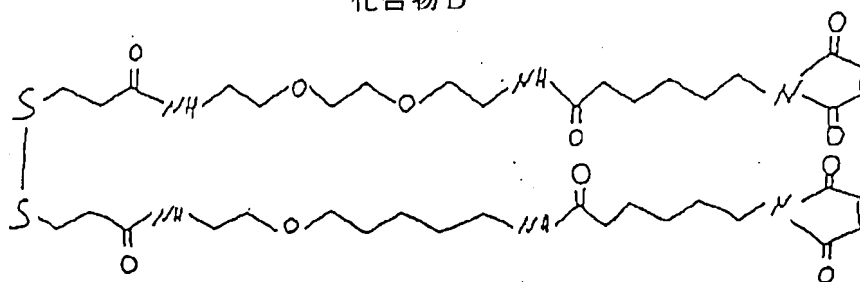
化合物 B



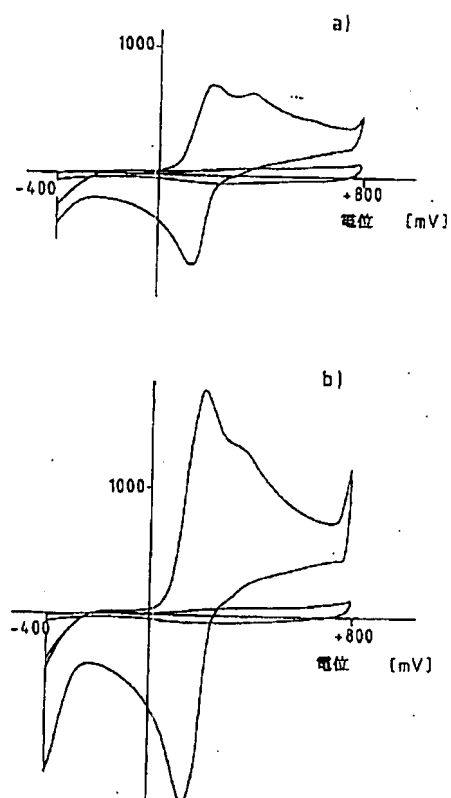
化合物 C



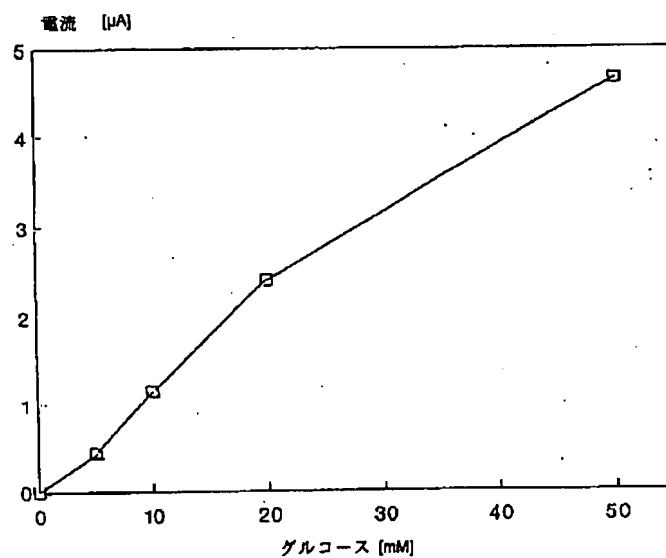
化合物 D



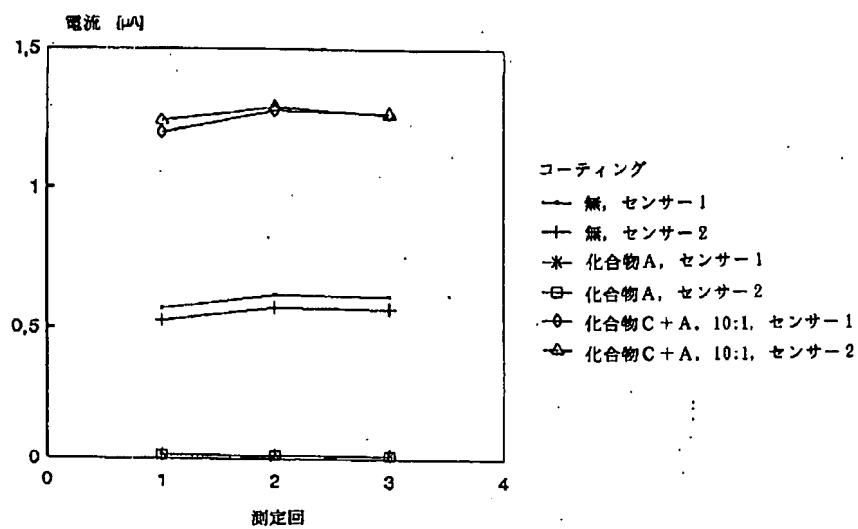
【図3】



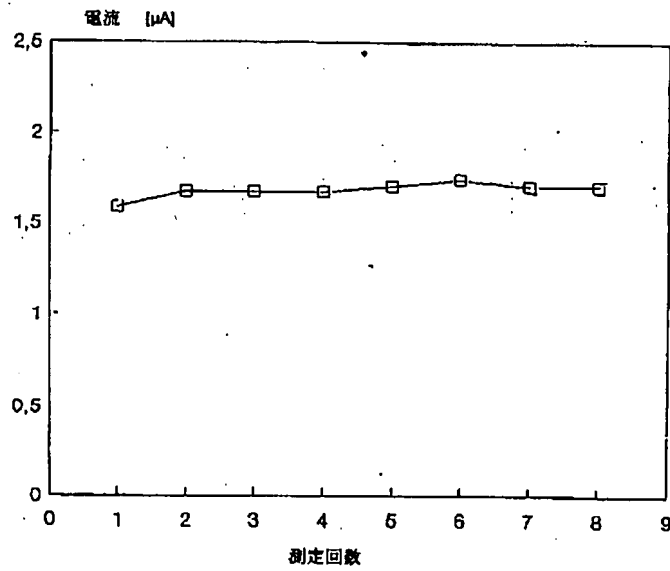
【図5】



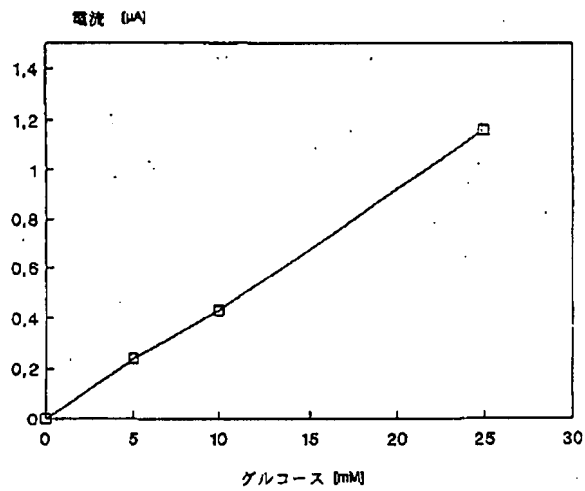
【図4】



【図6】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
C 0 7 D 495/04

識別記号 庁内整理番号
1 0 3

F I
C 0 7 D 495/04

技術表示箇所
1 0 3

(72) 発明者 ペルンド シュミット
ドイツ連邦共和国 D-81476 ミュンヘン
フォーシュテンリーダー アレー 83
番地

(72) 発明者 ペーター スルーカ
ドイツ連邦共和国 D-82362 ヴァイル
ハイム エステーアンナーヴェーク 17
番地

(72) 発明者 ハンスーヨアヒム グーダー
ドイツ連邦共和国 D-67269 グリュン
シュタット リンデンヴェーク 4 番地

(72)発明者 エアハート コペツキ
ドイツ連邦共和国 D-82377 ペンツベ
ルク カストナーホフシュトラッセ 21番
地